

Identificación ultraestructural de *Ehrlichia sp* en un perro de Venezuela infectado experimentalmente.

Nancy Gutiérrez¹, María Martínez¹, Cruz Arraga-Alvarado², Antonio Bretaña³, Italo Pacheco⁴ y Guillermo Comach¹.

¹Centro de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo - Núcleo Aragua.

²Unidad de Investigaciones Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

³Unidad de Microscopía Electrónica, Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios, Universidad Simón Rodríguez, Venezuela.

⁴Laboratorio de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela - Núcleo Maracay, Venezuela.

Palabras clave: Ehrlichiosis, *Ehrlichia*, *Ehrlichia canis*.

Resumen. El presente estudio constituye el primer reporte en Venezuela de las características ultraestructurales de *Ehrlichia sp* en células mononucleares de sangre periférica en un perro infectado experimentalmente, utilizándose para ello microscopía electrónica de transmisión. El animal desarrolló manifestaciones clínicas características de la infección y al realizar los extendidos sanguíneos coloreados con Giemsa modificado, se observaron al microscopio de luz las inclusiones intracitoplasmáticas características en células mononucleares. Al microscopio electrónico se evidenciaron microorganismos extremadamente pleomórficos que se corresponden con los cuerpos elementales dentro de vacuolas citoplasmáticas, rodeados por una doble membrana, cada uno constituido por gránulos electrodensos, características ultraestructurales que identifican al género *Ehrlichia*.

Ultraestructural identification of *Ehrlichia* sp in an experimental infected dog from Venezuela

Invest Clín 1999; 40(3): 165-177.

Key words: Ehrlichiosis, *Ehrlichia*, *Ehrlichia canis*.

Abstract. This study is the first report made in Venezuela concerning the ultrastructural characteristics of *Ehrlichia* sp in mononuclear blood cells from an experimentally infected dog. The animal developed clinical manifestations characteristic of the infection, and typical intracytoplasmic inclusion bodies were clearly seen in blood smears stained with modified Giemsa examined by light microscopy. Microorganisms were visualized by transmission electron microscopy. The cytoplasmic inclusions, consisted of membrane-lined vacuole-containing elementary bodies. The organisms were extremely pleomorphic. Elementary bodies were surrounded by two distinct membranes and each was constituted by electro-dense granules. These findings corresponded to the described electron microscopy morphology which characterizes the *Ehrlichia* genus.

Recibido: 29-6-98. *Aceptado:* 27-4-99.

INTRODUCCIÓN

La ehrlichiosis en el perro, es una enfermedad infecciosa transmitida por garrapatas (1, 2) y producida por bacterias intracelulares obligatorias, pleomórficas, gram negativas, inmóviles, clasificadas en el orden *Rickettsiales*, familia *Rickettsiaceae*, tribu *Ehrlichieae*, género *Ehrlichia* (3). Las ehrlichias tienen tropismo por leucocitos (4) y plaquetas circulantes (5) y ultraestructuralmente se observan como microorganismos dentro de vacuolas limitadas por membranas (3).

Las ehrlichias individuales o cuerpos elementales entran a la célula por fagocitosis, miden alrededor de 0,4 μm de diámetro, difíciles de observar con el microscopio de luz y se multiplican por fisión binaria

hasta formar los cuerpos de inclusión inmaduros que miden de 1,0 a 2,5 μm de diámetro denominados cuerpos iniciales (6). La división continúa dentro del fagosoma hasta formar las mórulas, cuerpos de inclusión maduros visibles al microscopio de luz, característicos del género *Ehrlichia* (6). Las características ultraestructurales del género *Ehrlichia* han permitido identificar a esta bacteria en monocitos sanguíneos de perros infectados naturalmente (7), en plaquetas de perros infectados experimentalmente (5, 8) y naturalmente (9).

Ehrlichia canis es el agente causal de la ehrlichiosis canina (EC), infecta linfocitos y monocitos sanguíneos (2, 4, 10) y el vector responsable de su transmisión es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*

(11, 12). Se describió por primera vez en 1935 por Donatien y Lestoquard en el Instituto Pasteur de Argelia (citados por McDade) (13) y en 1962 Ewing la reporta en los Estados Unidos (14).

La fase aguda de la EC está caracterizada por fiebre, anorexia, linfadenopatía, pérdida de peso, pancitopenia moderada (1, 15, 16) y en esta etapa se pueden detectar mórulas intracitoplasmáticas en linfocitos y monocitos sanguíneos (1, 17). Se describe una fase subclínica, con infección persistente de *E. canis*, con trombocitopenia, leucopenia variable y anemia en ausencia de manifestaciones clínicas (15, 16). En la fase crónica hay fiebre, pérdida de peso severa, edema periférico, hemorragia, epistaxis y pancitopenia marcada (1, 15). Se ha reportado como tratamiento efectivo el uso de oxitetraciclina o tetraciclina y doxiciclina (18, 19, 20, 21, 22, 23).

Ehrlichia ewingii, responsable de la ehrlichiosis granulocítica canina, tiene tropismo por granulocitos, principalmente neutrófilos (17, 24, 25) y es transmitida por la garrapata *Amblyoma americanum* (26). La fase aguda es más leve que la observada en la EC con fiebre transitoria, descargas óculonasales, linfadenomegalia y trombocitopenia. En la fase crónica hay edema periférico, linfadenomegalia y poliartritis supurativa. La leucocitosis, linfopenia y trombocitopenia son de presentación variable (25).

Ehrlichia platys produce la trombocitopenia cíclica infecciosa

(TCI) y parasita selectivamente las plaquetas (5, 9, 20). La infección está asociada con una trombocitopenia severa, sin evidencias de sangramiento, seguido de un período corto de recuperación del contaje plaquetario. La TCI es por lo general una enfermedad sin manifestaciones clínicas o si las hay son leves (9), aunque hay algunos reportes con sintomatología severa (10, 27, 28). Hasta los momentos no se conoce el vector de esta ehrlichia, pero se piensa que están implicadas las garrapatas (8, 29).

En Venezuela, Arraga reporta por primera vez en el Estado Zulia las tres especies en un estudio realizado desde 1982 hasta 1987 (10). En el país el diagnóstico se hace tomando en cuenta los signos clínicos del animal, pruebas hematológicas y observación con el microscopio de luz de inclusiones basófilas intracitoplasmáticas en leucocitos y plaquetas mediante la realización de frotis de capa blanca (FCB) teñidos con colorantes tipo Romanowski.

En el país y en Sur América se han realizado pocos estudios sobre EC y hasta ahora no se ha reportado ningún método que confirme la naturaleza de las inclusiones intracitoplasmáticas basófilas en células mononucleares y su asociación con la clínica.

Este estudio tiene por objeto reproducir la ehrlichiosis canina experimentalmente y demostrar la presencia del género *Ehrlichia* en células mononucleares sanguíneas, mediante microscopía electrónica de transmisión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inóculo

El microorganismo se obtuvo de un perro raza Doberman infectado naturalmente llevado a la consulta de La Policlínica Veterinaria de la Universidad del Zulia, presentando fiebre, anorexia, pérdida de peso, decaimiento, secreción óculonasal, leucopenia, trombocitopenia y en cuyo frotis se observaron las mórulas intracitoplasmáticas características en monocitos. La sangre fue obtenida de la vena cefálica utilizando como anticoagulante la sal sódica del ácido etelindiamino tetracético (EDTA) y conservada a 4°C durante 24 horas antes de la inoculación.

Inoculación experimental

El microorganismo fue transmitido por inoculación intravenosa de 2 ml de sangre infectada, de acuerdo a lo descrito por Carter y col (30), utilizándose para ello una perra de raza pura Pastor Alemán de año y medio de edad, la cual se mantuvo en una jaula de 4 m² aproximadamente, con iluminación y ventilación adecuada. El animal recibió alimento deshidratado comercial y agua *ad libitum*. Antes de la inoculación (día 0) se extrajo sangre utilizando como anticoagulante EDTA para realizar las siguientes pruebas hematológicas: a) conteo de leucocitos en cámara de Neubauer usando el líquido de Turk como diluyente; b) conteo de plaquetas por el método directo de Brecher Conkrite; c) determinación de hemoglobina por la técnica de la cianometahemoglobina y d) determinación

del hematocrito usando la técnica del microhematocrito. Para evidenciar las inclusiones intracitoplasmáticas leucocitarias se realizó frotis de capa blanca (FCB) obtenidos del hematocrito según técnica descrita por Carter y col (30), teñidos con coloración rápida de Giemsa modificada (Hemacolor de Merk) y observados en un microscopio Nikon a 1000X de magnificación utilizando el objetivo de inmersión. Estas mismas pruebas se realizaron cada 3 días durante 24 días y el día 40 postinoculación, iniciándose el tratamiento en el día 24 con oxitetraciclina a una dosis de 10 mg/kg/día vía endovenosa durante 10 días.

Microscopía electrónica

Se obtuvieron monocitos y linfocitos infectados, por gradiente de Ficoll - Hypaque, a partir de muestras de sangre colectadas utilizando como anticoagulante EDTA (31). Una vez obtenidas las células se procesaron de acuerdo a la técnica descrita por Dawson y col (32) con algunas modificaciones; para ello, las células se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos. El sedimento celular se fijó en glutaraldehído al 2 % en buffer fosfato 0,2 M (PB), luego se postfijó con tetraóxido de osmio al 1% en PB, seguidamente se deshidrató en concentraciones crecientes de etanol (50%, 75%, 95% y 100%) y se infiltró e incluyó en plástico (EMbed-812; Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA 19034, USA), utilizando el óxido de propileno como solvente intermedio. De los bloques se cortaron secciones finas (60-80 nm) con

un ultramicrotomo Porter Blum Sorvall MT2, se recogieron en rejillas de 200-mesh y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras fueron observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico de transmisión Phillips EM 208 a 60 kV.

RESULTADOS

Los parámetros hematológicos medidos después de la inoculación experimental mostraron cambios evidentes. En la Fig. 1A se observa trombocitopenia y leucopenia progresiva. El día cuando se inició el

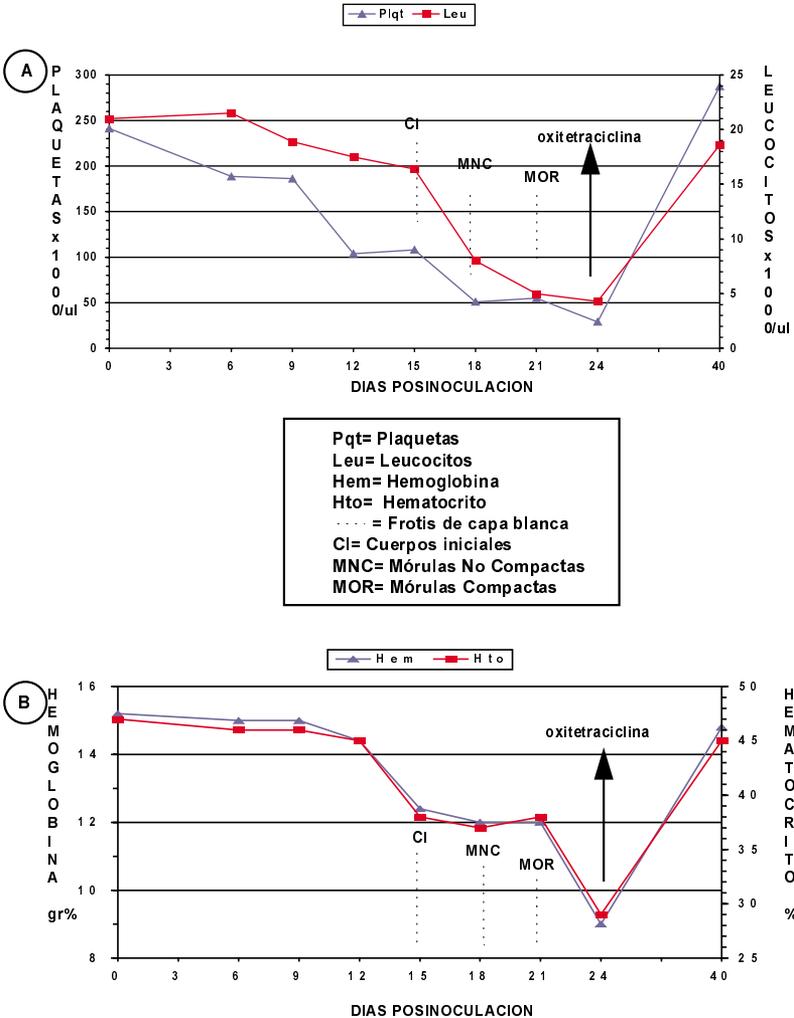


Fig. 1. Hallazgos hematológicos y frotis de capa blanca (FCB) de un perro infectado con *Ehrlichia* sp. (A) Contaje de plaquetas, leucocitos y FCB. (B) Concentración de hemoglobina y hematocrito.

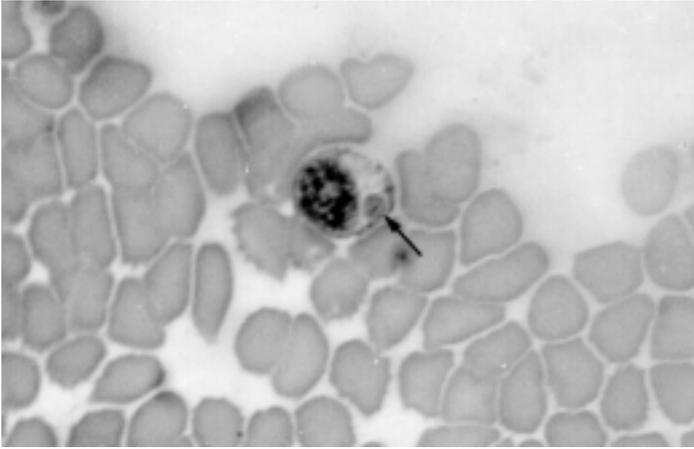


Fig. 2. Apariencia al microscopio de luz de mórula de *Ehrlichia* sp. en linfocito (flecha). Tinción de Giemsa modificado. 1.000 X.

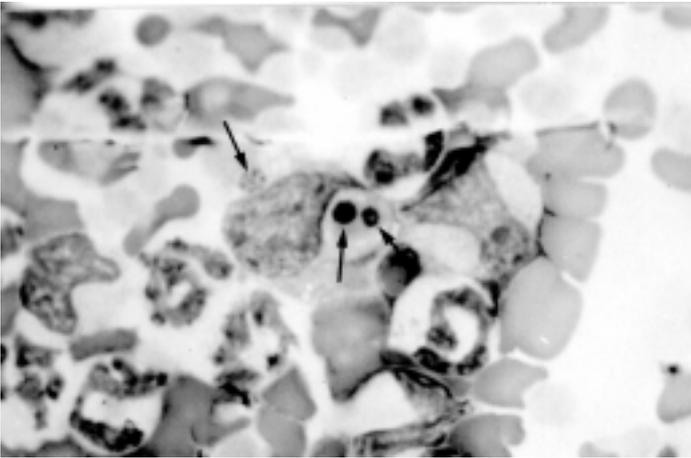


Fig. 3. Monocito con múltiples mórulas de *Ehrlichia* sp., dos compactas (flechas inferiores) y una sin compactar (flecha superior). Frotis de Capa Blanca. Tinción de Giemsa modificado. 1.000 X.

tratamiento con oxitetraciclina, el conteje plaquetario y leucocitario era de $29.000/\text{mm}^3$ y $4.300/\text{mm}^3$, respectivamente. La hemoglobina y el hematocrito (Fig. 1B) disminuyeron, con un descenso marcado en el día 24 postinoculación.

Al examen microscópico del FCB, se observaron en el día 15 pos-

tinfección cuerpos iniciales intracitoplasmáticos basófilos en células mononucleares, al día 18 se evidenciaron mórulas no compactas y, a partir del día 20, se observaron las mórulas compactas y basófilas, características de *Ehrlichia* sp tanto en linfocitos (Fig. 2) como en monocitos (Fig. 3). El número de mórulas varió

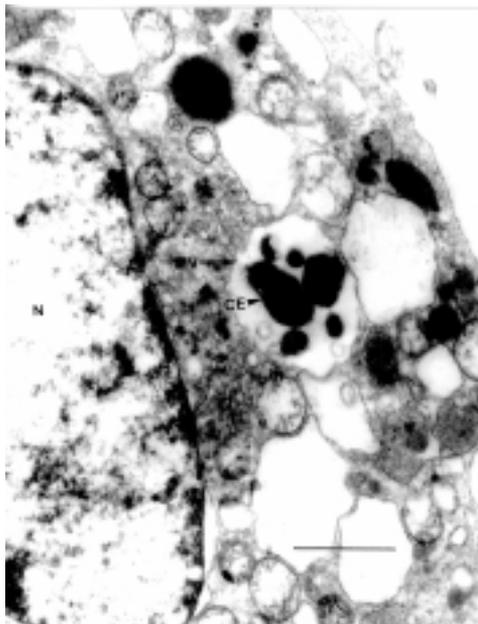


Fig. 4. *Ehrlichia* sp. en el citoplasma de célula mononuclear de perro infectado experimentalmente. Obsérvese vacuola con varios organismos ehrlichiales. Núcleo (N); membrana vacuolar (MV); cuerpo elemental (CE). Magnificación 23.500 X. Escala = 1 μ .

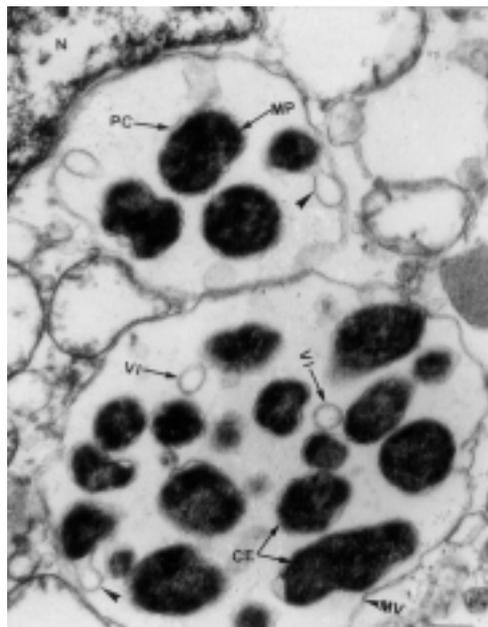


Fig. 5. *Ehrlichia* sp en el citoplasma de célula mononuclear sanguínea de perro infectado experimentalmente. Observe dos vacuolas con cuerpos elementales (CE) de diferentes formas y tamaños, rodeados por dos membranas distintas: la pared celular (PC) y la membrana plasmática (MP) Prolongación de la pared celular (punta de flecha) y vesículas intramurales (VI). Los cuerpos elementales están limitados por la membrana vacuolar (MV). Núcleo (N). Magnificación 28.800 X. Escala = 300 nm.

desde 1 a 3 por célula y hubo algunas en las que se observaron tanto mórulas compactas como no compactas (Fig. 3). Las manifestaciones clínicas más evidentes en el animal fueron anorexia, enflaquecimiento, enrojecimiento conjuntival y secreción nasal mucosanguinolenta. Una vez cumplido el tratamiento, la perra se recuperó clínicamente, los valores hematológicos retornaron a los iniciales y en el FCB no se visualizaron inclusiones intracitoplasmáticas.

Microscopía electrónica

En las células mononucleares (Figs. 4 y 5) se observaron vacuolas que contenían de 3 a 20 cuerpos elementales. Se evidenciaron formas ovaladas entre 0,6 μ m x 0,3 μ m a 1,2 μ m x 0,5 μ m y redondeadas entre 0,4 μ m a 0,7 μ m de diámetro.

Los cuerpos elementales a su vez estaban rodeados por una doble membrana (Fig. 5). La membrana externa, tiende a ser ondulada y se corresponde con la pared celular y una membrana plasmática interna, íntimamente unida a los constituyentes internos del microorganismo. La estructura interna de los cuerpos elementales estuvo formada por un predominio de gránulos electrodenso y escasas áreas claras.

En algunos cuerpos elementales se observó una elongación de la pared celular sin contenido electrodenso y vesículas intramurales de forma redondeada con un diámetro de 100 a 180 nm, y de forma ovalada de 240 nm x 150 nm. Los cuerpos iniciales y las mórulas presentaron forma redondeada con un tamaño que osciló entre 1,8 μm a 2,3 μm para los primeros y entre 2,6 μm a 3,4 μm para las segundas.

DISCUSIÓN

La ehrlichiosis canina es una enfermedad infecciosa producida por *E. canis* que afecta a cánidos y está ampliamente distribuida en el mundo particularmente en regiones tropicales y subtropicales (33), incluyendo a Venezuela, donde se reporta por primera vez en el Estado Zulia en 1982 (10). A partir de entonces se ha identificado en los Estados Aragua, Lara, Carabobo, Miranda, Nueva Esparta y Distrito Federal (34).

El curso clínico de la infección experimental en el perro de este estudio, es semejante al descrito por

Huxsoll y col (1) y Buhles y col (19) en sus experimentos, quienes reportan anorexia, enflaquecimiento, enrojecimiento conjuntival y secreción mucosanguinolenta; asimismo, coincide con lo reportado por Walker y col (15) en infecciones naturales de perros militares Pastores Alemanes en la epizootia ocurrida en el Sureste de Asia. El primer hallazgo hematológico que se evidenció fue la trombocitopenia, seguida de leucopenia y anemia, cambios que han sido descritos en estudios anteriores (1, 15, 19, 35). La evolución clínica y de laboratorio del perro con la infección experimental es compatible con la ehrlichiosis canina o pancitopenia tropical canina.

Al realizar los FCB con sangre del perro infectado experimentalmente y utilizando el microscopio de luz se logró determinar las características morfológicas y de tinción de las mórulas intracitoplasmáticas en linfocitos y monocitos, coincidiendo con las reportadas hasta los momentos (1, 6, 7, 14, 30, 36). Asimismo, se pudieron observar las mórulas difusas y compactas descritas por Huxsoll y col (1) que se corresponden con las mórulas no compactas y compactas visualizadas en este estudio. El uso de la oxitetraciclina mejoró rápidamente los signos clínicos y hematológicos y produjo la desaparición del microorganismo en sangre periférica, notándose la alta eficacia del medicamento en la fase aguda de la enfermedad, hecho referido por Amyx y col (18).

Las características ultraestructurales del género *Ehrlichia*, junto

con su tropismo por leucocitos y plaquetas circulantes, han permitido su ubicación taxonómica. La ultraestructura de la *Ehrlichia* mononuclear canina del presente trabajo concuerda con la descrita en otras especies de este género, tales como: *E. canis* (2, 7, 37, 38), *E. risticii* (39, 40), *E. muris* (41) y *E. chaffeensis* (32) y constituye el primer reporte en Venezuela y Sur America de *Ehrlichia* sp de perros. En todos se presentan como organismos individuales intracitoplasmáticos dentro de vacuolas limitadas por membrana rodeados a su vez por una pared celular externa y una membrana plasmática interna, características que se corresponden con la morfología normal de células ehrlichiales (42).

La elongación en la pared celular da la impresión que origina las estructuras redondeadas electrolúcidas que se observan en el interior de las mórulas, denominadas por Walker y Dumler (43) como vesículas intramóculares. De la misma manera, Popov y col (42) reportan estas estructuras como formas anormales de la ehrlichia, considerando que estas alteraciones se deben a una sobreproducción de la pared celular. El mecanismo por el cual ocurren estos fenómenos es desconocido; es probable que sean consecuencia de la respuesta de la bacteria a los cambios intracelulares y representen el proceso degenerativo propio de la ehrlichia en el interior celular.

Todo lo observado, tanto en las manifestaciones clínicas como en la

ultraestructura se corresponde con lo descrito para *E. canis* por lo que es probable que el microorganismo inoculado sea el mismo. Esto sugiere la importancia de iniciar el tratamiento inmediato de aquellos perros que presenten una clínica similar a la descrita y las inclusiones intracitoplasmáticas basófilas en los frotis sanguíneos coloreados, con la finalidad de evitar las complicaciones y las fases subclínica y crónica de la enfermedad. Sin embargo, es necesario continuar los estudios antigénicos, serológicos y moleculares que permitan, por una parte, identificar la especie circulante en nuestro país y, por otra, garantizar la disponibilidad de un método diagnóstico que permita confirmar la sospecha clínica de esta enfermedad en perros.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por FUNDACITE Aragua (DLSA-0032) y CDCH-Universidad de Carabobo (96-014). Expresamos nuestro agradecimiento al personal del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Carabobo (CIMBUC); al Dr. Francisco García y Dra. Mary García de la cátedra de Parasitología; al Dr. Pedro Avilán de la cátedra de Cirugía y al Dr. Héctor Castillo Jefe de la sección de caninos del Dpto. de Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela - Núcleo Maracay, por la colaboración prestada en la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HUXSOLL D., HILDEBRANT P., NIMS R., WALKER J.: Tropical canine pancytopenia. *J Am Vet Med Assoc* 1970; 157(2):1627-1632.
2. HILDEBRANT P., CONROY J., MCKEE A., NYINDO M., HUXSOLL D.: Ultraestructure of *Ehrlichia canis*. *Infect Immun* 1973; 7(2):265-271.
3. RISTIC M., HUXSOLL D.: Tribu II *Ehrlichiae*. en: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1.R. Krieg and J.G. Holt eds. The Williams & Wilkins Co., Baltimore 1984. pp: 704-709.
4. CAMPBELL R.: Pathogenesis and pathology of the complex rickettsial infection. *Veterinary Bulletin* 1994; 64(1):1-18.
5. HARVEY J., SIMPSON C., GASKIN J.: Cyclic thrombocytopenia induced by a *Rickettsia*-like agent in dogs. *J Infect Dis* 1978; 137(2):182-188.
6. NYINDO M., RISTIC M., HUXSOLL D., SMITH A.: Tropical canine pancytopenia: *in vitro* cultivation of the causative agent- *Ehrlichia canis*. *Am J Vet Res* 1971; 32(11):1651-1658.
7. SIMPSON C.: Structure of *Ehrlichia canis*. *Am J Vet Res* 1972; 33(12):2451-2454.
8. ARRAGA-ALVARADO C., PARRA O., PALMAR M., CHANGO R., ALVARADO M.: *Ehrlichia platys*: preparación del antígeno y uso de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en caninos y humanos. *Rev Cient Vet LUZ* 1997; VII(2):30-40.
9. MATHEW J., EWING S., MURPHY G., KOCAN K., CORSVET R., FOX J.: Characterization of a new isolate of *Ehrlichia platys* (order *Rickettsiales*) using electron microscopy and polymerase chain reaction. *Vet Parasitol* 1997; 68:1-10.
10. ARRAGA-ALVARADO C.: Ehrlichiosis canina en Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. Reporte de 55 casos. *Rev Cient Vet LUZ* 1992; II(2):30-40.
11. CONRAD M.: Review: *Ehrlichia canis*: a tick-borne rickettsial-like infection in humans living in the southeastern United States. *Am J Med Sc* 1989; 297(1):35-37.
12. GROVES M., DENNIS G., AMYX H., HUXSOLL D.: Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am J Vet Res* 1975; 36(7):937-940.
13. MCDADE J.: Ehrlichiosis - A disease of animals and humans. *J Infec Dis* 1990; 161:609-616.
14. EWING S.: Observations on leukocytic inclusion bodies from dogs infected with *Babesia canis*. *J Am Vet Med Assoc* 1963; 143(5):503-506.
15. WALKER J., RUNDQUIST J., TAYLOR R., WILSON L., ANDREWS M., BARCK J., HOGGE A., HUXSOLL D., HILDEBRANT ., NIMS R.: Clinical and clinicopathologic findings in tropi-

- cal canine pancytopenia. *J Am Vet Med Assoc* 1970; 157(1): 43-55.
16. HARRUS S., BARK H., WANER T.: Canine monocytic ehrlichiosis: An update. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1997; 19(4): 431-444.
17. ANDERSON B., GREENE C., JONES D., DAWSON J.: *Ehrlichia ewingii* sp. nov. The etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42(2):299-302.
18. AMYX H., HUXSOLL D., ZEILER D., HILDEBRANT P.: Therapeutic and prophylactic value of tetracycline in dogs infected with the agent of tropical canine pancytopenia. *Am J Vet Res* 1971; 159:1428-1432.
19. BUHLES W., HUXSOLL D., RISTIC M.: Tropical canine pancytopenia: clinical, hematologic, and serologic responses of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. *J Infect Dis* 1974; 103(4):357-367.
20. HIBLER S., HOSKINS J., GREENE C.: Rickettsial infections in dogs. Part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. *Compend Cont Educ Pract Vet* 1986; 8(2):106-115.
21. PRICE J., SAYER P.: Canine ehrlichiosis. en: *Current Veterinary Therapy vol. VIII*. Kirk R ed.. Saunders W.B.Co., Philadelphia., 1983. pp: 1197-1201.
22. SILVESTRE P.: *Productos farmacéuticos veterinarios*. Séptima edición. Venezuela. Tipografía Cervantes., 1996. p. 30.
23. BREITSCHWERDT E., HEGARTY B., HANCOCK S.: Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(2): 362-368.
24. EWING S., ROBERSON W., BUCKNER R., HAYAT C.: A new strain of *Ehrlichia canis*. *J Am Vet Med Assoc* 1971; 159(12): 1771-1774.
25. STOCKMAN S., SCHMIDT D., CURTIS K., SCHAUF B., TYLER J., SIMPSON S.: Evaluation of granulocytic ehrlichiosis in dogs of Missouri, including serologic status to *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Borrelia burgdorferi*. *Am J Vet Res* 1992; 53(1):63-68.
26. ANZIANI O., EWING S., BARKER R.: Experimental transmission of granulocytic form of the tribe *Ehrlichieae* by *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum* to dogs. *Am J Vet Res* 1990; 51(6):929-931.
27. GLAZE M., GAUNT S.: Uveitis associated with *Ehrlichia platys* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 188(9):916-917.
28. WILSON J.: *Ehrlichia platys* in a Michigan dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1992; 28:381-383
29. SIMPSON R., GAUNT S., HAIR, J., KOCAN K., HENK W.,

- CASEY H.: Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. *Am J Vet Res* 1991; 52(9):1537-1541.
30. CARTER G., SEAMER J., SNAPE T.: Diagnosis of Tropical Canine Pancytopenia (*Ehrlichia canis* infection) by immunofluorescence. *Rev Vet Sci* 1971; 12:318-322.
 31. BÖYUM A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21 Suppl 97 (paper IV):77-89.
 32. DAWSON J., ANDERSON B., FISBEIN D., SANCHEZ J., GOLDSMITH C., WILSON K., DUNTLEY W.: Isolation and characterization of *Ehrlichia sp* from patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29(12):2741-2745.
 33. IQBA Z., CHAICHANASIRI-WITHAYA W., RIKIHISA Y.: Comparasion of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32(7):1658-1662.
 34. GARCÍA F., RIVERA M., GARCÍA M., GONZÁLEZ M., AVILÁN P.: Situación actual de la casuística de la ehrlichiosis canina en perros de Maracay. Análisis de diagnóstico de laboradores. *Bol de Inst Mejoramiento profesional "Paulo Llamosa", Fed. Col. Vet. Mimec* 1992.
 35. HARRUS S., WANER T., KEYSARY A., AROCH I., VOET H., BARK H.: Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 62: 15-27.
 36. EWING S., BUCKNER A.: Manifestations of babesiosis, ehrlichiosis, and combined infections in the dog. *Am J Vet Res* 1965; 26(113):815-828.
 37. DAWSON J., RIKIHISA Y., EWING S., FISBEIN D.: Serologic Diagnosis of human ehrlichiosis using two *Ehrlichia canis* isolates. *J. Infect Dis* 1991; 163:564-567.
 38. KEYSARY A., WANER T., ROSNER M., WARNER C K., DAWSON J E., ZASS R., BIGGIE K L., HARRUS S.: The first isolation, *in vitro* propagation, and genetic charaterization of *Ehrlichia canis* in Israel. *Vet Parasitol* 1996; 62:331-340.
 39. KAKOMA I., HANSEN R., ANDERSON B., HANLEY T., SIMS K., LIU L., BELLAMY C., LONG M., KIRL B.: Cultural, molecular and immunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32(1): 170-175.
 40. RIKIHISA Y.: The tribu *Ehrlichiae* and ehrlichial diseases. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4(3): 286-308.
 41. WEN B., RIKIHISA Y., MOTT J., FUERST P., KAWAHARA M., SUTO CH.: *Ehrlichia muris sp* nov., identified on the basis of 16S rRNA base sequences and serological, morphological, and biological characteristics. *Int J*

- Syst Bacteriol 1995; 45(2): 250-254.
42. POPOV V., HAN V., CHEN S., DUMLER J., FENG H., ANDREADIS T., TESH R., WALKER D.: Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. J Med Microbiol 1998; 47(3): 235-251.
43. WALKER D., DUMLER J.: Emergence of the ehrlichiosis as human health problems. Emerg Infect Dis 1996; 2(1):18-29.